

## **РАЗДЕЛ II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

---

### **СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ ТРЕТ-БУТИЛГИДРОПЕРОКСИДА И СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН, ДЕНИТРОЗИЛИРУЮТ S-НИТРОЗОГЕМОГЛОБИН И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ S-НИТРОЗОТИОЛЫ**

**Адамчук Р.И., Степура А.И., Опарин А.Ю., Степура И.И.**

*ГУ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»*

В настоящее время в научной литературе широко обсуждается вопрос о механизмах стабилизации оксида азота, образующегося в биологических системах. Эта стабилизация необходима для переноса NO, как регулятора метаболических процессов, из клеток доноров в клетки мишени его действия. Высокая скорость реакции свободного NO с супероксидом приводит к тому, что распространение лабильной молекулы оксида азота в свободной молекулярной форме без включения в состав комплексов или соединений, способных его стабилизировать, становится маловероятным. Предполагается, что такая стабилизация достигается путем включения NO либо в S-нитрозотиолы, либо в динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. Анализ взаимоотношения между этими соединениями, проведенный в работах показал, что возможны их взаимопревращения. После стабилизации лабильная молекула оксида азота может выполнять не только аутокринные, но и паракринные функции.

Существует множество литературных источников, свидетельствующих, что S-нитрозотиолы являются промежуточными звеньями в гуанилат-независимой передаче сигналов оксида азота. Реакционноспособные тиольные остатки белков рассматриваются, как главная внутриклеточная мишень для оксида азота. Хотя существуют данные о потенциальной способности некоторых ферментов влиять на метаболизм S-нитрозотиолов, большинство cGMP-независимых эффектов оксида азота реализуется путём неферментативных реакций. Основной транспортной формой NO в плазме крови человека являются S-нитрозотиолы белков. Концентрация нитрозилированных белков составляет микромолярные количества и основная доля в них принадлежит сывороточному альбумину и гемоглобину. Из всех низкомолекулярных сульфидрильных соединений наибольшую концентрацию в клетке имеет глутатион. Под действием эндогенного NO, синтезируемого в

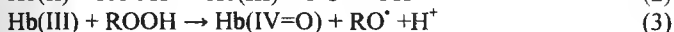
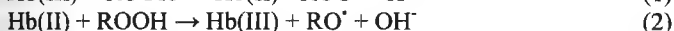
экспрессирующих iNOS клетках, до 10 % глутатиона превращается в нитрозоглутатион. Через нитрозоглутатион в реакции транснаитрозилирования, происходит образование других нитрозотиолов. Следовательно, можно предположить, что нитрозотиолы выполняют в организме буферную функцию в качестве резервного источника NO.

Проведенные ранее нами исследования нитрит-редуктазной активности дезоксигемоглобина позволило показать, что давление кислорода в крови задает уровень генерации оксида азота дезоксигемоглобином. Большему уровню дезоксигемоглобина соответствует больший выход оксида азота, вследствие восстановления нитрита. Эритроциты «чувствуют» давление кислорода и гомеостатически регулируют доставку крови и кислорода к тканям с кислородной недостаточностью. Нитрит под действием дезоксигемоглобина трансформируется в оксид азота, S-нитрозогемоглобин и S-нитрозоглутатион. S-нитрозотиолы метаболизируются на клеточной поверхности и при помощи реакций транснаитрозилирования и денитрозилирования обеспечивают передачу сигнала сосудистому эндотелию, возможно, с участием сывороточного альбумина. В данной работе мы показали, что следовые количества метгемоглобина в присутствии органических пероксидов катализируют денитрозилирование S-нитрозоглутатиона и других S-нитрозотиолов. Мы предполагаем, что свободные радикалы трет-бутилпероксида и свободные радикалы продуктов перекисного окисления эритроцитарных мембран, разрушают S-NO связи в S-нитрозогемоглобине и S-нитрозоглутатине, что снижает уровень физиологического депо оксида азота в организме.

**Методы исследования.** Метгемоглобин получали обработкой раствора оксиHb 4-10-кратным избытком  $K_3[Fe(CN)_6]$  в 0,05 М Na-фосфатном буфере (pH 7,0), с последующей фильтрацией смеси на колонке с сефадексом G-25. Концентрацию метгемоглобина определяли спектрофотометрически по поглощению на 630 нм ( $\epsilon = 3700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ). S-нитрозоглутатион (GSNO) и S-нитрозо-метгемоглобин синтезировали и по методу близкому к описанному в литературе, с небольшими модификациями. Концентрацию оксида азота связанного с сульфгидрильным группам низкомолекулярных тиолов и сульфгидрильными группами гемоглобина определяли по методу Савилья. Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) получали после экспозиции отмытых «теней» эритроцитов в течение 30 мин. в ультразвуковом поле 880 кГц, интенсивность 2 Вт/см<sup>2</sup>. Продукты ПОЛ определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты. Трет-бутилгидропероксид фирмы «Сигма» США, остальные реактивы высокой степени очистки производства Беларуси и России.

Результаты и обсуждение.

Органическая водорастворимая трет-бутилгидроперекись является аналогом гидроперекисей мембранных липидов, накапливающихся в мембранах клеток в процессах перекисного окисления липидов. В реакциях между гемопroteинами и органическими гидропероксидами возникают алкоксильные и алкилпероксидные радикалы, являющиеся интермедиатами свободно-радикального окисления липидов.



Образовавшийся вследствие разрушения молекулы трет-бутилгидропероксида алкоксильные или алкилпероксидные радикалы менее реакционные, чем гидроксильный радикал и поэтому они диффундируют из гемового кармана в объем раствора. Цистеиновые остатки — 93  $\beta$ -цепях соседствуют с дистальным His-92, который организует гемовый карман. Мы предполагаем, что между S-нитрозильной группой цистеинового остатка, которая находится на выходе из гемового кармана, и алкильными и алкилпероксидными радикалами протекает реакция (4 - 6) приводящая к разрушению S-нитрозотиолов.

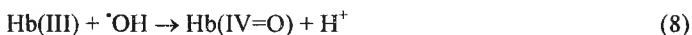


При воздействии пероксида водорода на S-нитрозогемоглобин не наблюдали разрушения S-нитрозильной группой цистеинового остатка, которая находится на выходе из гемового кармана (табл. 1).

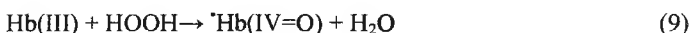
Таблица 1 - Влияние пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и трет-бутилгидропероксида (ТБГП) на устойчивость —SNO связи в S-нитрозометгемоглобине (MetHb-SNO) в присутствии и в отсутствие тиаминa (Т) при инкубации в фосфатном буфере. Концентрация тиаминa —1,0 мМ, MetHb - SNO— 5-мкМ, ТБГП и  $\text{H}_2\text{O}_2$ — 0,01 М., К-фосфатный буфер, pH 7,4, 0,05 М

Содержимое проб	C-SNO, мкМ
MetHb-SNO+T+ $\text{H}_2\text{O}_2$	1,31
MetHb-SNO	1,35
MetHb-SNO+ $\text{H}_2\text{O}_2$	1,30
MetHb-SNO+T+ТБГП	0,09
MetHb-SNO +ТБГП	0,06

Взаимодействие пероксида водорода с метгемоглобином можно представить в виде двухстадийного процесса. Пероксид водорода претерпевает распад на гидроксильные радикалы. Метгемоглобин первоначально взаимодействует с гидроксильным радикалом с образованием оксоферрильной формы  $\text{Hb(IV=O)}$  или соединение II и катион железа имеет валентность + 4.



Второй гидроксильный радикал взаимодействует с ближайшими функциональными группами порфирина с образованием свободного радикала, который затем окисляет тирозинильный остаток гемоглобина и образуется  $\cdot\text{Hb(IV=O)}$  или соединение I. Следовательно, в реакциях между метгемоглобином и пероксидом водорода образуется оксоферрильная форма гемоглобина (соединение I), с радикалом, локализованным на белковой глобуле и молекула воды.



В реакциях между S-нитрозометгемоглобином и пероксидом водорода также происходит окисление ферри-катиона в оксоферрильную форму  $\cdot\text{Hb(IV=O)}$  с радикалом, локализованным на белковой глобуле. Свободные радикалы в этом случае, в отличие от взаимодействия метгемоглобина с трет-бутилгидропероксидом, (реакции 1 и 2) не образуются. Это связано с тем, что гидроксильные радикалы очень реакционны и сразу же взаимодействуют с порфириновым циклом в месте их образования и не выходят из гемового кармана (табл. 1). Трет-бутилгидропероксид медленно окисляет GSNO. Следовые количества метгемоглобина (менее 0,5 мкМ) ускоряют окисление GSNO трет-бутилгидропероксидом более чем на порядок. Мы показали, что гидрофобный метаболит тиамин-тиохром эффективно защищает S-нитрозотиолы от денитрозилирования под действием алкоксильных и пероксидных радикалов. Тиамин (табл. 1) проявляет слабую антиоксидантную активность. Продукты ПОЛ, полученные экспозицией «теней» эритроцитов в ультразвуковом поле также катализируют окисление S-нитрозоглутатиона в присутствии метгемоглобина. Взаимодействие метгемоглобина с органическими пероксидами приводит к образованию алкоксильных и алкилпероксидных радикалов. Антиоксиданты фенольной природы ( $\alpha$  — токоферол, аскорбиновая кислота, флавоноиды и др.) эффективно реагируют с пероксидными радикалами.

Полученные нами результаты свидетельствуют о важности использования, для коррекции дисфункции эндотелия, не только антиоксидантных соединений фенольной природы, являющихся эффективными ловушками пероксидных радикалов, но и соединений обладающих выраженными гидрофобными свойствами и высокой реакционной способностью в отношении алкоксильных радикалов и активных форм азота. Мы предполагаем, что именно тиохром может явиться эффективным антиоксидантом, взаимодействующим с активными формами кислорода, азота, а также пероксидными и алкоксильными радикалами, и тем самым стабилизирующим уровень S-нитрозотиолов в организме.

Литература:

1. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа-эндогенные сигнальные агенты в клетках и тканях животных и человека // Биофизика.-2004.-Т. 49.-С. 581-586.
2. Vanin A.F., Malenkova V.V., Serezhenko V.A. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies // Nitric Oxide.-1997.-Vol. 1.-P. 191-203.
3. Stamler J. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide // Cell.-1994.-Vol. 78.-P. 931-936.
4. Weunmalm A., Benthin G., Peterson A.S. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin // Br. J. Pharmacol.-1992.- Vol. 106.- P. 507-508.
5. Степура И. И., Чайковская Н. А, Солодунов А. А, Арцукевич А. Н. // Биохимия.-1997.-т. 62.-С. 1122-1129.
6. Kempen G., Zijlstrat W. // Adv. Clin. Chem.-1983.-Vol. 23.-P. 199-257.
7. Stamler J.S., Loscalzo J. Capillary zone electrophoretic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives // Anal. Chem.-1992.-Vol. 64.-P. 779-785.
8. Saville B. // Analyst. - 1958. - Vol. 83. - P. 670-672.
9. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах // М. Наука.- 1972.- с.252.
10. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine.— 3-th ed. // Oxford: Clarendon Press.- 1999. - P. 288.

## **УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА МИОКАРДА ПРИ ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ**

**Арчакова Л.И., Манеева О.А.**

*ГУ «Институт физиологии НАН Беларуси»*

Важная роль в становлении и прогрессировании хронической сердечной недостаточности различной этиологии принадлежит эндотелиальной дисфункции. Как известно, последняя обусловлена